

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

Offenlegungsschrift

⑯ DE 197 07 227 A 1

⑯ Int. Cl. 6:

G 01 N 21/63

G 01 N 21/64

G 01 N 21/55

G 01 N 21/59

G 01 N 21/19

⑯ Aktenzeichen: 197 07 227.5

⑯ Anmeldetag: 24. 2. 97

⑯ Offenlegungstag: 27. 8. 98

⑯ Anmelder:

Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH, 88662
Überlingen, DE

⑯ Erfinder:

Wulf, Jürgen, Dr., 88662 Überlingen, DE

⑯ Vertreter:

Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
Anwaltssozietät, 80538 München

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Lichtabtastvorrichtung

⑯ Die vorliegende Erfindung betrifft eine Lichtabtastvorrichtung zur Anregung und Detektion einer Emission von Sekundärlicht, insbesondere von Fluoreszenzlicht, von einer Probe mit einer Lichterzeugungsvorrichtung zur Erzeugung des Abtastlichts in Form eines einzigen Lichtstrahlenbündels, einer Ablenkeinheit zur in wenigstens einer Richtung veränderbaren Ablenkung des Abtastlichts zur Abtastung wenigstens einer Teilfläche der Probe, einer Abbildungseinheit zur Abbildung von von der Probe ausgehendem Sekundärlicht, und einer Nachweisseinheit zur Detektion des Sekundärlichts. Bei der Fluoreszenzuntersuchung einer Probe mit großer Abrasterungsfläche und gleichzeitig hoher Ortsauflösung treten unerwünscht lange Abtastzeiten auf. Zur Verringerung der Abtastzeit unter gleichzeitiger Beibehaltung der hohen Auflösung bei einer solchen Probe besitzt erfindungsgemäß die Lichtabtastvorrichtung eine Aufteilungsvorrichtung zur Aufteilung des einzigen Lichtstrahlenbündels in wenigstens zwei Lichtstrahlenbündel. Dadurch wird anstelle der bisherigen sequentiellen Abtastung der Probe eine Unterteilung in Felder durchgeführt, die simultan durch die mehreren Lichtstrahlen abgetastet werden. Damit lässt sich entsprechend der Anzahl der simultan abgetasteten Felder der Probe die Abtastzeit verringern.

DE 197 07 227 A 1

DE 197 07 227 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Lichtabtastvorrichtung zur Anregung und Detektion einer Emission von Sekundärlicht, insbesondere von Fluoreszenzlicht, von einer Probe mit einer Lichterzeugungsvorrichtung zur Erzeugung von Abtastlicht in Form eines einzigen Lichtstrahlenbündels, einer Ablenkeinheit zur in wenigstens einer Richtung veränderbaren Ablenkung des Abtastlichts zur Abtastung wenigstens einer Teilfläche der Probe, einer Abbildungseinheit zur Abbildung von von der Probe ausgehendem Sekundärlicht und einer Nachweiseinheit zur Detektion des Sekundärlichts.

Lichtabtastvorrichtungen der zuvor genannten Art werden beispielsweise zur ortsaufgelösten Fluoreszenzuntersuchung einer Probe verwendet. Dabei wird in der genannten Vorrichtung zur Erzeugung des Abtastlichts in Form eines einzigen Strahlenbündels, bei der es sich zumcist um einen Laser handelt, ein engbegrenztes und auf die Probe fokussiertes Strahlenbündel erzeugt, das mittels einer Ablenkvorrichtung, z. B. in Form von Kippspiegeln mit zwei zueinander senkrecht stehenden Kipp- bzw. Drehachsen im optischen Weg des Lichtstrahlenbündels, über die Probe gerastrert wird. Das Abtastlicht regt auf der Oberfläche einer Probe die Erzeugung von Sekundärlicht an, z. B. in der Form von Fluoreszenzlicht. Dieses Sekundärlicht wird über eine Abbildungsoptik gesammelt und auf einer Nachweiseinheit detektiert. Da die Ablenkeinheit in Abhängigkeit von der Stellung der Kippspiegel zueinander und relativ zur Probe auf genau definierbare Weise jeweils einen bestimmten Fleck auf der Probe bestrahlt, kann mittels der Nachweiseinheit, die die Intensität des Sekundärlichts erfäßt, eine ortsabhängige Aussage über die entsprechende Eigenschaft der Probe getroffen werden.

Die Abtastzeit für die Vermessung der gesamten Probe hängt von verschiedenen Parametern ab, wie der Größe des Bildfeldes auf der Probe, des Abtastinkrements, der Fleckgröße des Abtaststrahls auf der Probe, der Integrationszeit der Nachweiseinheit, der Abtastgeschwindigkeit bzw. Spiegelgeschwindigkeit der Ablenkeinheit und dem gewünschten Signal-zu-Rauschverhältnis. Bei Proben mit Abmessungen im Zentimeterbereich und hoher Ortsauflösung mit einem auf wenige Mikrometer fokussierten Abtaststrahlenbündel ergeben sich Abtastzeiten im Minuten- bis Stundenbereich. Derart lange Abtastzeiten stellen jedoch ein großes Problem beim Betrieb solcher Lichtabtastvorrichtungen dar.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine verbesserte Lichtabtastvorrichtung zur Abtastung einer Probe und zum Nachweis von durch das Abtastlicht angeregter Sekundärstrahlung zu schaffen, mit der eine schnellere und effizientere Abtastung einer großen Probe unter hoher Ortsauflösung erzielbar ist.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch eine Lichtabtastvorrichtung der eingangs genannten Art, die sich dadurch auszeichnet, daß eine Aufteilungsvorrichtung vorgesehen ist zur Aufteilung des einzigen Lichtstrahlenbündels in wenigstens zwei Lichtstrahlenbündel. Durch die Aufteilung des einzigen Lichtstrahlenbündels in wenigstens zwei Lichtstrahlenbündel wird die gesamte Fläche der Probe nicht mehr wie bisher sequentiell abgetastet, sondern es werden wenigstens zwei Gebiete der Probe durch die wenigstens zwei Abtaststrahlenbündel simultan abgerastert. Dadurch kann bei gleicher Ortsauflösung die Abtastzeit im wesentlichen halbiert werden.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung umfaßt die Aufteilungsvorrichtung wenigstens einen, besser jedoch zwei keilförmige Doppelspiegel, insbesondere Strahlteiler mit jeweils einer ersten und zweiten Fläche, an denen

ein einziges einlaufendes Strahlenbündel unter Bildung von zwei Strahlenbündeln reflektiert wird, die unter einem dem Keilwinkel des Strahlteilers entsprechenden Winkel zueinander stehen. Bei der bevorzugten Verwendung von zwei Doppelspiegeln werden aus dem anfänglichen einzigen Strahlenbündel vier Strahlenbündel erzeugt. Durch die Aufteilung des einlaufenden Strahlenbündels in vier Strahlenbündel findet eine Unterteilung der Probe in vier Quadranten statt, wodurch die Abtastzeit im wesentlichen auf ein Viertel der entsprechenden Abtastzeit bei Verwendung eines einzigen Strahlenbündels verringert werden kann. Vorteilhafterweise sind die beiden keilförmigen Doppelspiegel oder Strahlteiler Teil der Ablenkeinheit und stellen die jeweiligen Kippspiegel mit zueinander senkrecht stehenden Drehachsen dieser Einheit, die mit entsprechenden Stellgliedern gekoppelt sind, dar.

In einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist ein fokussierendes Objektiv zwischen der Ablenkeinheit und der Probe vorgesehen. Es ist insbesondere vorteilhaft, ein F/θ-Objektiv zu verwenden, das die Lichtstrahlenbündel unabhängig von der Ablage, d. h. dem Abstand von der optischen Achse, scharf fokussiert. Diese Art der Anordnung des fokussierenden Objektivs zwischen der Ablenkeinheit und der Probe wird als "Pre-Objective-Scanning" bezeichnet.

In einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung besteht die Nachweiseinheit aus einem ortsauflösenden Detektorarray, wie z. B. einer CCD-Kamera oder einem Mehrkanalmultipli er oder einem Mehrkanalhalbleiterelement. Zur Vermin-30 derung unerwünschten Übersprechens der einzelnen Kanäle, die den von den einzelnen Lichtstrahlenbündeln abgetasteten Bereichen auf der Probe entsprechen, kann eine spezielle, an die jeweils abgetasteten Probenbereiche angepaßte Blende vor dem Detektor vorgesehen werden.

Bei Messung in transmittiver Anordnung ist es vorteilhaft, hinter der Probe möglichst die gesamte Fläche mit Lichtleitern zu versehen, wobei die einem jeden Abtastgebiet der Probe zugeordneten Lichtleiter zu einem Bündel zusammengefaßt sind und einer entsprechenden Detektorfläche oder einem eigenen Detektor zugeleitet werden. Beispielsweise werden bei einer Unterteilung der Probe in vier Quadranten die Lichtleiter in vier Bündel zusammengefaßt und auf vier verschiedene Detektoren geleitet, so daß die vier Quadranten gleichzeitig vermessen werden können. 45 Dabei ist es möglich, Farbfilter vor den Detektoren anzurichten, um einerseits das Anregungslicht zu unterdrücken und andererseits eine Selektion des Sekundärlichts durchzuführen. Die numerische Apertur der Lichtleiter beschränkt das 50 Gesichtsfeld der Sekundärlichtemission und verhindert so mit ein Kanalübersprechen. Falls die Probe aus gleichartigen Fluoreszenzfarbstoffen besteht, kann jeder der einem Abtastfeld der Probe zugeordneten Detektoren mit einem anderen Farbfilter ausgestattet werden, so daß z. B. bei Verwendung von vier Detektoren vier verschiedene Emissionswellenlängen gleichzeitig gemessen werden können.

Anstelle der Verwendung von verschiedenen, über Lichtleiterbündel mit der Probe gekoppelten Detektoren wäre es in einer weiteren Weiterbildung der Erfindung auch möglich, eine CCD-Kamera hinter der Probe bei transmittiver 60 Anordnung anzurichten. Um ein Mischen des Fluoreszenzlichts aller Kanäle in der Kamera zu verhindern, wird eine Platte aus Lichtleitfasern mit geringer numerischer Apertur vor die Kamera gestellt. Damit läßt sich ein Kanalübersprechen wirksam verhindern.

In einer weiteren vorteilhaften Weiterbildung der erfindungsgemäßen Lichtabtastvorrichtung ist ein Aufbau vorgesehen zur Erfassung des Sekundärlichts in reflektiver nichtkonfokaler Anordnung. Zur Schaffung der nichtkonfokalen

Anordnung, d. h. einer Ausbildung des Strahlengangs des Sekundärlichts derart, daß die Spiegel der Ablenkeinheit in dessen Strahlengang nicht enthalten sind, ist vorteilhafterweise ein dichroitischer Strahlteiler zwischen der Ablenkeinheit und der Probe vorgesehen, mit dem der optische Weg des Abtastlichts vom optischen Weg des von der Probe ausgehenden Sekundärlichts separierbar ist. Insbesondere ist der dichroitische Strahlteiler für das Anregungslicht mit einer ersten kürzeren Wellenlänge durchlässig, während er das Sekundärlicht mit einer längeren Wellenlänge reflektiert.

Weitere vorteilhafte Ausführungsformen gehen aus den Unteransprüchen hervor.

Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung beispielhaft anhand einer bevorzugten Ausführungsform unter Bezug auf die begleitenden Zeichnungen näher erläutert und beschrieben. In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 cinc Skizzc zur Veranschaulichung des prinzipiellen Aufbaus und des Strahlengangs einer erfindungsgemäßen Lichtabtastvorrichtung;

Fig. 2 ein Beispiel für eine Aufteilungsvorrichtung in Form einer keilförmigen Strahlteilerplatte mit dem entsprechenden Strahlengang;

Fig. 3 eine Skizze zur Veranschaulichung der verschiedenen Detektionskanäle in einer erfindungsgemäßen Lichtabtastvorrichtung; und

Fig. 4 eine Skizze zur Veranschaulichung der Unterteilung einer Probe in vier Quadranten.

In **Fig. 1** wird beispielhaft ein schematischer Aufbau einer erfindungsgemäßen Lichtabtastvorrichtung gezeigt. In einer Lichterzeugungsvorrichtung **20**, z. B. einem Laser, wird ein einziges Lichtstrahlenbündel **21** bestimmter Wellenlänge erzeugt. Das von der Lichterzeugungsvorrichtung bzw. dem Laser erzeugte Lichtstrahlenbündel wird vorteilhafterweise in einem nichtgezeigten Raumfilter räumlich gefiltert. Das parallele Strahlenbündel wird durch eine beispielsweise zwei Linsen **22** und **24** umfassende Aufweitungsoptik in ein wiederum paralleles Strahlenbündel mit größerem Querschnitt aufgeweitet. Als nächstes Element im optischen Weg folgt eine Ablenkeinheit **10** mit Kippspiegeln **11** und **12**, die zueinander senkrecht stehende Drehachsen aufweisen und an nicht gezeigte Stellglieder mit entsprechenden Ansteuerungen zur gegenseitigen Verstellung bzw. Verkippung angeschlossen sind, um das Strahlenbündel **21** in zwei Richtungen zu rastern. Wie nachfolgend in bezug auf **Fig. 2** näher erläutert wird, bestehen in einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung die Kippspiegel **11** und **12** jeweils aus keilförmigen Doppelspiegeln oder Strahlteilerplatten, die somit eine Aufteilungsvorrichtung zur Aufteilung des einzigen einlaufenden Laserstrahlbündel in insgesamt vier voneinander getrennte Laserstrahlbündel bilden. Aus Gründen der übersichtlicheren Darstellung sind in **Fig. 1** nur zwei Strahlenbündel **22** und **23** gezeigt.

Zwischen der Ablenkeinheit **10** mit den Kippspiegeln **11** und **12** ist eine Fokussierungsoptik angeordnet, die beispielsweise ein Linsentriplett aus Linsen **26**, **28** und **30** umfaßt. Bei dieser Fokussierungsoptik handelt es sich vorteilhafterweise um ein F/θ-Objektiv, das die Strahlenbündel unabhängig von der Ablage scharf auf Fleckgrößen im Mikrometerbereich auf eine Probe **40** fokussiert. Bei dem F/θ-Objektiv wird eine Abbildung der Abtaststrahlbündel gemäß der sog. F/θ-Bedingung $y' = F \times \theta$ durchgeführt, wobei y' die Abbildungsordinate, F die Brennweite und θ der Winkel ist, den das Abtaststrahlbündel mit der optischen Achse einschließt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Objektiven, bei denen die sonst übliche Bedingung $y' = F \times \tan\theta$ gilt, führt das F/θ-Objektiv zu einer tonnenförmigen Verzeichnung. Dadurch wird jedoch eine Proportionalität zwischen

dem Abtastwinkel und der Bildhöhe y' und zugleich auch eine Proportionalität zwischen der Winkelgeschwindigkeit des Ablenksystems und der Abtastgeschwindigkeit in der Probenebene sichergestellt. Bei konstanter Winkelgeschwindigkeit für die Ablenkung des Strahlenbündels wird somit aufgrund der Linearität zwischen der Abtastgeschwindigkeit auf der Probe und der Winkelgeschwindigkeit eine konstante Anregungsintensität auf der Probe unabhängig von der Abtastposition geschaffen.

Diese Art der Anordnung der Fokussierungsoptik zwischen der Ablenkeinheit **10** mit den Kippspiegeln **11** und **12** und der Probe **40** wird als "Pre-Objective-Scanning" bezeichnet. Dies wird häufiger angewandt als ein "Post-Objective-Scanning", bei dem die Fokussierungsoptik im optischen Weg vor der Ablenkeinheit **10** angeordnet ist, so daß das nach der Fokussierungsoptik konvergente Abtastlicht über die Abtastspiegel abgelenkt und auf die Probe **40** geleitet wird. Bei dieser Art der Anordnung der Fokussierungsoptik vor der Ablenkeinheit **10** werden an das Objektiv nur minimale Forderungen gestellt. Es kann einen kleinen Durchmesser haben und braucht nur im paraxialen Gebiet scharf abzubilden. Die hinter dem Objektiv angeordnete Ablenkeinheit führt jedoch zu einer gekrümmten Abtastlinie, die auf einem Kreisbogen um die Drehachse des Kippspiegels liegt. Zum Abtasten ebener Oberflächen ist daher diese Anordnung des "Post-Objective-Scanning" nicht bevorzugt.

Daher ist die "Pre-Objective-Scanning"-Anordnung mit einem F/θ-Objektiv, mit dem eine Abbildung in eine Ebene mit einer zum Ablenkinkel proportionalen Bildkoordinate möglich ist, vorteilhaft. Das F/θ-Objektiv in der "Pre-Objective-Scanning"-Anordnung muß jedoch einen relativ großen Durchmesser aufweisen, um auch Abtaststrahlbündel mit großem Abtastwinkel noch aufzunehmen. Es muß auch über einen relativ großen Bildwinkel entsprechend der Verkipfung des Lichtstrahlbündels gegenüber der optischen Achse korrigiert sein und es muß ferner eine gute Bildfeldebnung aufweisen.

Zwischen der Fokussierungsoptik und der Probe **40** ist ein dichroitischer Spiegel **32** angeordnet, der das Anregungslicht mit der bestimmten Wellenlänge durchläßt und das auf oder von der Probe **40** erzeugte Sekundärlicht, das eine zum Anregungslicht unterschiedliche, d. h. längere, Wellenlänge aufweist, reflektiert. In der Reflexionsrichtung des dichroitischen Spiegels **32** ist nachfolgend eine Sammelloptik **34** und ein Detektor **50** angeordnet.

Die in **Fig. 1** gezeigte Anordnung stellt den Fall der Messung des Sekundärlichts in reflektiver, nichtkonfokaler Anordnung dar. Die nichtkonfokale Anordnung besitzt den Vorteil, daß ein größerer Raumwinkel für das von der Probe emittierte Sekundärlicht als bei konfokaler Abbildung aufgenommen werden kann.

Trotzdem wäre im Gegensatz dazu auch eine konfokale Anordnung (in **Fig. 1** nicht gezeigt) möglich, bei der das von der Probe emittierte Sekundärlicht über die gleichen Kippspiegel **11** und **12** zurückgeleitet wird, so daß der exakt gleiche Strahlengang wie für das Abtastlicht rückwärts durchlaufen wird. Der dichroitische Spiegel wäre in dieser Anordnung zwischen der Lichtquelle **20** und der Ablenkeinheit **10** vorgesehen, um die optischen Wege des Anregungslichts und des wellenlängenverschobenen Sekundärlichts zu trennen. Durch zusätzliche Fokussierung des Sekundärlichts auf eine (nicht gezeigte) Lochblende, z. B. mit einem Loch im Mikrometerbereich, könnte unerwünschtes Streulicht weitgehend unterdrückt werden. Bei der konfokalen Anordnung wird jedoch nur ein sehr kleiner Raumwinkel des Sekundärlichts, der durch die Spiegelaperturen begrenzt ist, erfaßt, wenn gleichzeitig ein größeres Gesichtsfeld abgetastet werden soll.

Im Gegensatz zu der in **Fig. 1** gezeigten Anordnung wäre es auch möglich, anstatt der reflektiven Anordnung in transmittiver Anordnung zu messen. Bei der transmittiven Anordnung muß das Abtast- bzw. Anregungslicht mit Hilfe von (nicht gezeigten) Filtern (z. B. Notch-Filtern bzw. Kantenfiltern) geblockt werden, die ihrerseits Licht auf die Probe reflektieren und somit eine Verschmierung des Anregungslichtflecks auf der Probe bewirken. Aus diesem Grund ist die in **Fig. 1** gezeigte Reflexionsanordnung gegenüber der transmittiven Anordnung vorteilhaft.

In **Fig. 2** ist ein Beispiel für eine erfundungsgemäße Realisierung der Aufteilungsvorrichtung zur Aufteilung des einzigen Lichtstrahlenbündels in wenigstens zwei Lichtstrahlenbündel gezeigt. Die Aufteilungsvorrichtung besteht dabei aus einer keilförmigen Strahlteilerplatte **110**, an deren erster Oberfläche **112** und zweiter Oberfläche **114** die Lichtstrahlen eines einfallenden Lichtstrahlenbündels **116** jeweils reflektiert werden zur Erzeugung zweier Lichtstrahlenbündel **118** und **119**. Vorteilhafterweise ist der in **Fig. 1** gezeigte Kippspiegel **12** in der Form der in **Fig. 2** gezeigten keilförmigen Strahlteilerplatte **110** ausgebildet. Insbesondere ist es günstig, beide Kippspiegel **11** und **12** der Ablenkeinheit **10** in **Fig. 1** jeweils durch eine wie in **Fig. 2** gezeigte Strahlteilerplatte **110** auszubilden, wodurch eine Aufteilung des einzigen einfallenden Lichtstrahlenbündels in vier Lichtstrahlenbündel erfolgt. In diesem Fall wird die Probe **40** wie in **Fig. 4** gezeigt in vier Quadranten **43**, **44**, **45** und **46** unterteilt. Die Fläche eines jeden Quadranten der Probe wird jeweils von einem der vier Strahlenbündel des Abtastlichts bei entsprechender Verstellung der Kippspiegel abgetastet. Bei einer abgetasteten Probe mit einer makroskopischen Abmessung von etwa 24×24 mm wird daher die Zeitdauer für eine vollständige Abtastung der Probe auf ein Viertel der bisher notwendigen Zeit verringert. Daher ist es möglich, weiterhin unter vertretbaren Zeiten für die Abtastung einer großen Probe die Strahlenbündel des Abtastlichts stärker als bisher zu fokussieren zur Erhöhung der Ortsauflösung bei der Abtastung.

Wenn der Abtastlichtstrahl auf einen Punkt fokussiert wird, kann Streulicht auch Nachbarmoleküle erreichen, deren Sekundärlicht bei nichtkonfokaler Abbildung mitgenommen wird und der momentanen Position der Kippspiegel der Abtasteinheit zugeordnet wird. Ein nicht konfokaler Aufbau könnte trotzdem noch vorteilhaft sein, da bei einem konfokalen Ausbau das Signal wesentlich kleiner ist aufgrund des geringeren Raumwinkels. Zudem wird die zuvor genannte Schwierigkeit in bezug auf das Streulicht durch die erfundungsgemäße Anordnung vermindert, da eine Erhöhung der Auflösung, d. h. eine stärkere Fokussierung des Abtaststrahls ohne das Auftreten eines erhöhten Zeitaufwands bei der Abtastung der Probe, möglich ist.

Ein weiterer Vorteil der beschriebenen Ausführungsform besteht darin, daß durch die Aufteilung des Abtastlichtstrahlenbündels in vier Lichtstrahlenbündel und eine entsprechende Aufteilung der Probe in vier Quadranten jedes der Abtastlichtstrahlenbündel jeweils nur eine kleinere Fläche überdecken muß. Damit sind nur geringere Auslenkungen der Kippspiegel **11** und **12** erforderlich, die mit geringeren Fehlern bzw. Toleranzen realisierbar sind. Die Kippbewegung der Kippspiegel wird dabei so angepaßt, daß die in **Fig. 4** gezeigten Quadranten **43-46** jeweils vollständig durch die entsprechenden Teilstrahlenbündel überstrichen werden.

Vorteilhafterweise ist der Keilwinkel der Strahlteilerplatten so groß, daß der makroskopische Abstand der einzelnen Strahlenbündel auf der Probe groß ist gegenüber der mittleren Streulänge innerhalb der Probe. Bei dem Beispiel einer Probe mit 24×24 mm Fläche ist dieser Abstand optimaler-

weise 12 mm.

In **Fig. 4** ist schematisch der prinzipielle Aufbau der verschiedenen Detektionskanäle gezeigt. An der Probe **40** wird an zwei Stellen durch Strahlenbündel **61** und **62** dargestelltes Sekundärlicht erzeugt. Dieses Licht wird am dichroitischen Spiegel **32** wie zuvor erwähnt reflektiert und durch ein beispielsweise aus drei Linsen **35**, **36** und **37** bestehendes Makroobjektiv auf den Detektor **50** fokussiert. Jeder Punkt der Probenebene entspricht dabei eindeutig einem Punkt in der Detektorebene. Bei dem Detektor handelt es sich vorteilhafterweise um eine CCD-Kamera oder einen Mehrkanalfotomultiplier, z. B. das Modell R5900U-00-M4 von Hamamatsu, oder ein Mehrkanalhalbleiterelement. Derartige Detektoren sind zur simultanen Erfassung mehrerer Kanäle geeignet. Die jeweiligen Abtastfelder der Probe (z. B. vier Quadranten) werden entsprechend auf die Detektorebene abgebildet. Zur Unterdrückung eines unerwünschten Übersprechens der Kanäle kann eine spezielle, an die Unterteilung der Probe angepaßte Blende **52** vor dem Detektor vorgesehen sein. Für die zuvor erwähnte Ausführungsform mit vier Abtaststrahlenbündeln besitzt die Blende **52** eine entsprechende Unterteilung in vier Quadranten.

Im Gegensatz zu der in **Fig. 1** und **3** gezeigten Anordnung zur Messung des Sekundärlichts in Reflexion ist es auch möglich, in transmittiver Anordnung zu messen. Dabei wird z. B. hinter der Probe die gesamte Fläche mit Lichtleitern versehen, wobei jeder Quadrant zusammengefaßt wird zu einem Bündel. Es werden dann vier Bündel auf vier verschiedene Detektoren geleitet, die gleichzeitig vermessen werden können. Zur Unterdrückung des Anregungslichts und zur Selektion des Sekundärlichts können spezielle Filter vor den Detektoren vorgesehen werden. Die numerische Apertur der Lichtleiter beschränkt das Gesichtsfeld der Sekundärlichtemission und verhindert somit ein Kanalübersprechen. Falls die Probe aus gleichartigen Fluoreszenzfarbstoffen besteht, kann jeder der einem Quadranten zugeordneten Detektoren mit einem anderen Farbfilter ausgestattet werden, so daß bis zu vier verschiedene Emissionswellenlängen gleichzeitig gemessen werden können. Alternativ dazu ist es möglich, einfach eine CCD-Kamera hinter der Probe vorzusehen. Diese Kamera würde jedoch das Fluoreszenzlicht aller vier Kanäle mischen. Dies wird verhindert, indem man eine Platte (sog. Face-Platte) aus Lichtleitfasern mit geringer numerischer Apertur vor die Kamera stellt, um das Kanalübersprechen zu unterdrücken.

Patentansprüche

1. Lichtabtastvorrichtung zur Anregung und Detektion einer Emission von Sekundärlicht, insbesondere von Fluoreszenzlicht, an einer Probe (**40**) mit einer Lichterzeugungsvorrichtung (**20**) zur Erzeugung von Abtastlicht in Form eines einzigen Lichtstrahlenbündels (**21**), einer Ablenkeinheit (**10**) zur in wenigstens einer Richtung veränderbaren Ablenkung des Abtastlichts zur Abtastung wenigstens einer Teilfläche der Probe (**40**), einer Abbildungseinheit (**34; 35, 36, 37**) zur Abbildung von von der Probe ausgehendem Sekundärlicht (**61**, **62**), und einer Nachweiseinheit (**50**) zur Detektion des Sekundärlichts, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Aufteilungsvorrichtung (**110**) im optischen Weg des Abtastlichts vorgesehen ist zur Aufteilung des einzigen Lichtstrahlenbündels in wenigstens zwei Lichtstrahlenbündel (**22, 23; 118, 119**).
2. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch

gekennzeichnet, daß die Aufteilungsvorrichtung (110) ein keilförmiger Doppelspiegel mit einem Winkel miteinander bildenden ersten und zweiten Spiegelflächen (112, 114) ist, an denen das einzige Lichtstrahlenbündel (116) unter Bildung von zwei den gleichen Winkel miteinander einschließenden Lichtstrahlenbündeln (118, 119) reflektiert wird. 5

3. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufteilungsvorrichtung zwei derart angeordnete, keilförmige Doppelspiegel (110) umfaßt, daß an dem ersten keilförmigen Doppelspiegel das einzige Lichtstrahlenbündel unter Bildung von zwei Lichtstrahlenbündeln reflektiert wird, die auf den zweiten keilförmigen Doppelspiegel treffen und an diesem unter Bildung von vier Lichtstrahlenbündeln reflektiert werden. 15

4. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden keilförmigen Doppelspiegel Teil der Ablenkeinheit (10) sind und mit Stellvorrichtungen zur Drehung und/oder Verschiebung der jeweiligen Doppelspiegel zur Abtastung der Probe verbunden sind. 20

5. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1–4, dadurch gekennzeichnet, daß eine Fokussierungsoptik (26, 28, 30) zwischen der Aufteilungsvorrichtung und der Probe zur Fokussierung aller Lichtstrahlenbündel auf die Probe vorgesehen ist. 25

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Fokussierungsoptik ein F/θ-Objektiv umfaßt. 30

7. Lichtabtastvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweiseinheit (50) zur ortsaufgelösten Detektion des Sekundärlichts geeignet ausgebildet ist.

8. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nachweiseinheit (50) entsprechend der Zahl der auf die Probe auftreffenden Abtastlichtstrahlenbündel in Felder unterteilt ist. 35

9. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 8, wobei eine entsprechend der Felder der Nachweiseinheit unterteilte Blende (52) vor der Nachweiseinheit angeordnet ist. 40

10. Lichtabtastvorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Abbildungseinheit (34; 35, 36, 37) zur Aufnahme von durch die Probe (40) transmittiertem Sekundärlicht geeignet angeordnet ist. 45

11. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnete daß auf der der Einfallsseite des Abtastlichts gegenüberliegenden Seite der Probe (40) zu einem Bündel zusammengefaßte Lichtleiter vorgesehen sind, die entsprechend den jeweiligen Abtastgebieten der auf die Probe auftreffenden Abtastlichtstrahlenbündel an ihrem detektorseitigen Ende in Teilbündel aufgeteilt sind, denen jeweils eigene Detektoren zugeordnet sind. 50

12. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Teilbündeln aus Lichtleitern und den jeweiligen Detektoren jeweils ein Wellenlängenfilter vorgesehen ist. 60

13. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Wellenlängenfilter Farbfilter für jeweils unterschiedliche Wellenlängen des Sekundärlichts sind.

14. Lichtabtastvorrichtung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Abbildungseinheit eine Platte aus Lichtleitfasern mit geringer numerischer Apertur umfaßt und daß die Nachweiseinheit (50) eine 65

CCD-Kamera umfaßt.

15. Lichtabtastvorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1–9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Aufbau zur Erfassung des Sekundärlichts in reflektiver, nichtkonfokaler Anordnung vorgesehen ist.

16. Vorrichtung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Abbildungseinheit einen dichroitischen Strahlteiler (32) umfaßt, mit dem der optische Weg des Abtastlichts von dem des von der Probe ausgehenden Sekundärlichts separierbar ist.

17. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichterzeugungsvorrichtung (20) zur Erzeugung des Abtastlichts in Form eines einzigen Lichtstrahls einen Laser umfaßt.

18. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lichterzeugungsvorrichtung zur Erzeugung des Lichtstrahls eine Vorrichtung zur räumlichen Filterung des einzigen Lichtstrahls umfaßt.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

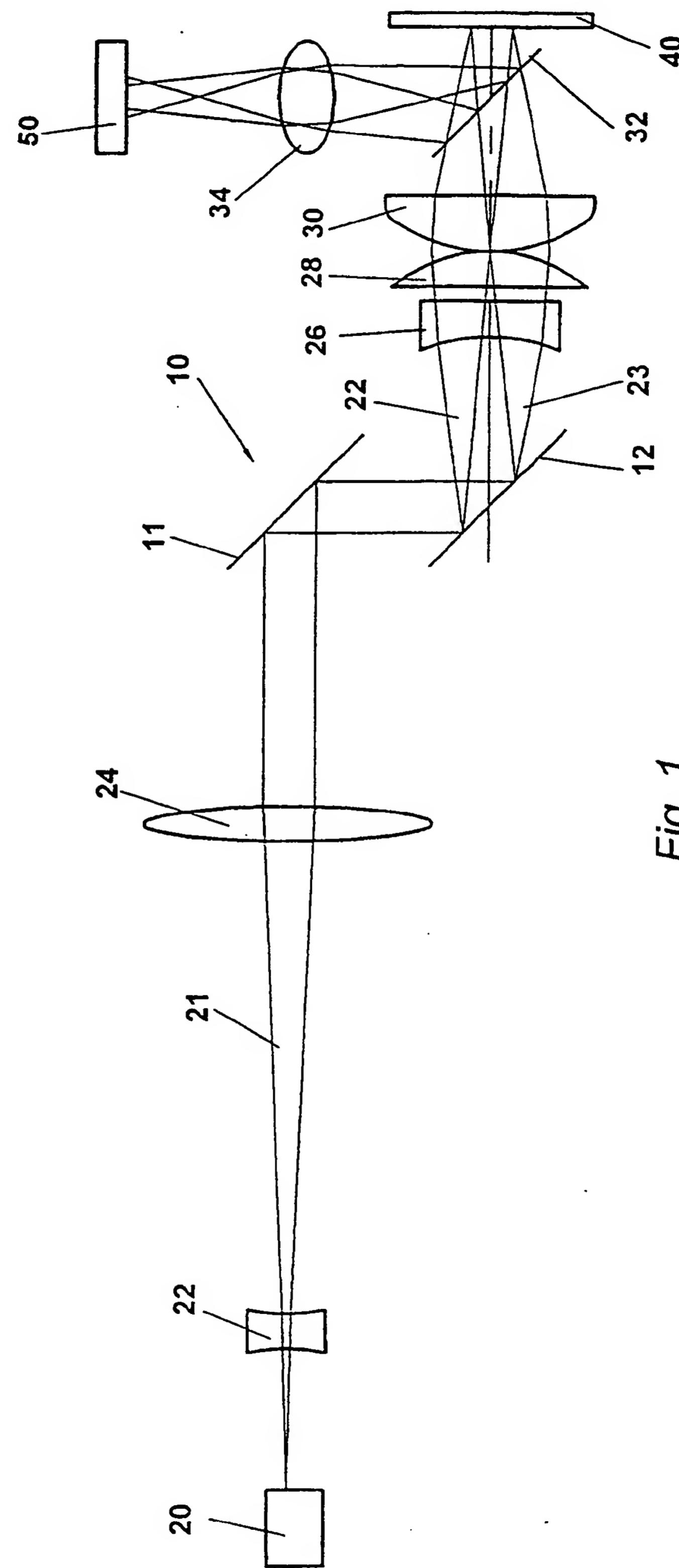


Fig. 1

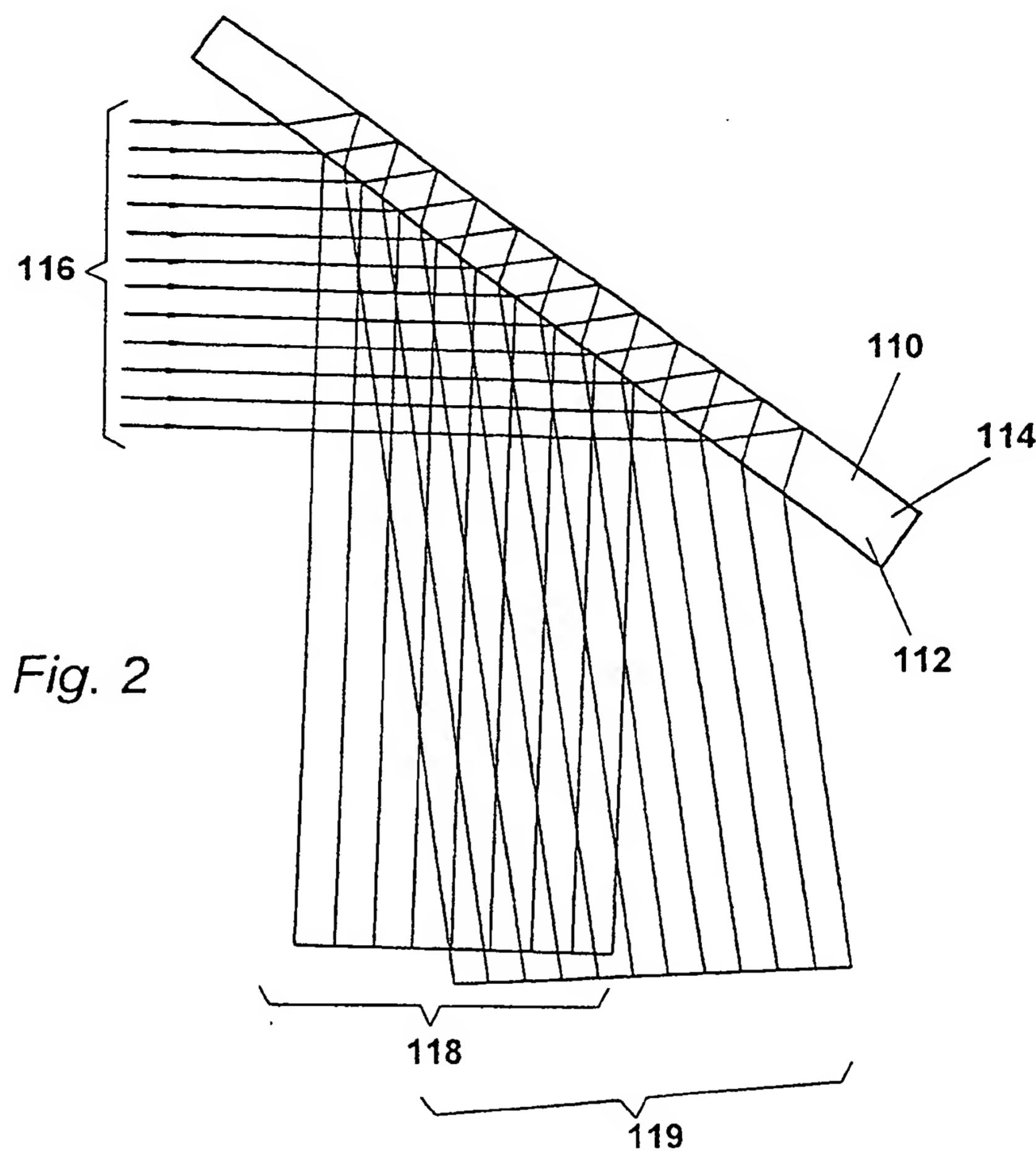
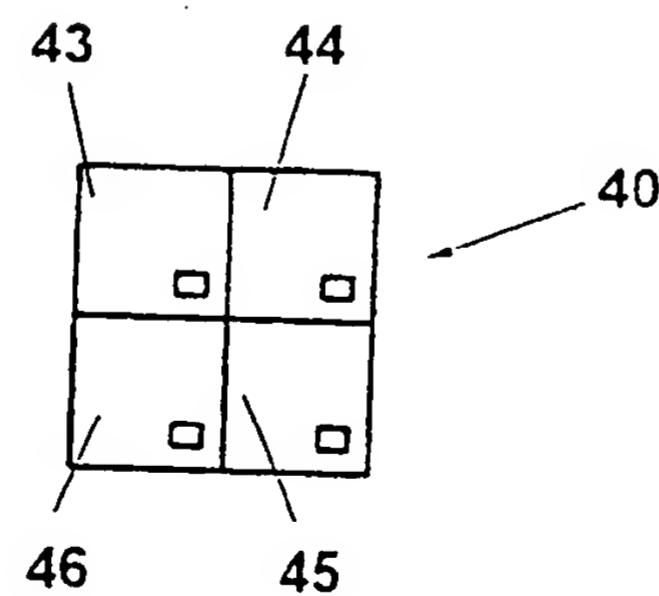


Fig. 4



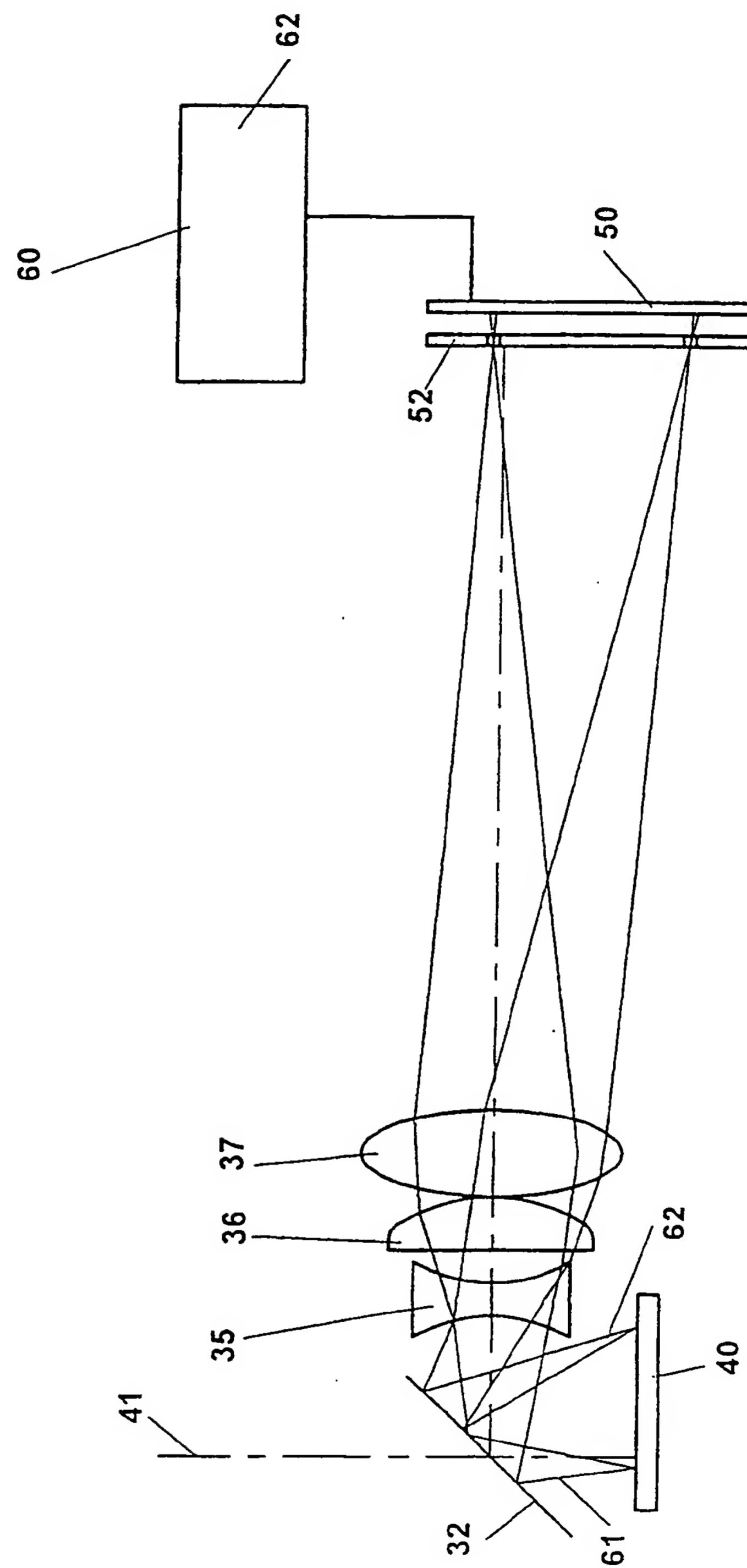


Fig. 3